

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory (bakalářské studium)

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Miroslav DŮRA

**METODY MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE V PREDIKTIVNÍ DIAGNOSTICE
HER2/NEU U KARCINOMU ŽALUDKU**

**METHODS OF MOLECULAR BIOLOGY IN PREDICTIVE DIAGNOSTICS
OF HER2/NEU IN STOMACH CANCER**

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Ing. Bc. Libor Staněk

Praha, 2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 31.7.2014

podpis

Poděkování

Rád bych na tomto místě poděkoval Mgr. Ing. Bc. Liborovi Staňkovi, vedoucímu této bakalářské práce, za jeho odborné vedení a cenné připomínky.

Abstrakt

Karcinom žaludku je zhoubné nádorové onemocnění, jehož podstatou je maligní přeměna epitelu žaludeční sliznice. Toto onemocnění je charakteristické pro pacienty vyšších věkových skupin, častěji postihuje muže. Karcinom je typický svou chudou symptomatologií a časným zakládáním metastáz. V současné době je zaznamenán mírný pokles incidence. Léčba karcinomu žaludku je závislá na jeho lokalizaci a stádiu. Pro relativní chemo- a radiorezistenci karcinomu je chirurgická léčba jedinou potenciálně kurativní léčbou, avšak s vysokým procentem recidiv.

Asi u 10 - 20 % pacientů s karcinomem žaludku je prokázána amplifikace a overexprese receptoru HER2. Tato overexprese koreluje s horší prognózou onemocnění. U těchto pacientů je však prokázáno signifikantní prodloužení doby přežití při léčbě monoklonální protilátkou *trastuzumab*, Herceptin®, která se v současné době používá s úspěchem u pacientek s karcinomem prsu, u nichž se amplifikace HER2 prokáže.

Léčba trastuzumabem může být účinná pouze tehdy, pokud je stanovena HER2 pozitivita tumoru, a to dostatečně specifickou a sensitivní metodou. Tato práce má za cíl shrnout metody molekulární biologie, které jsou používány pro stanovení HER2 statu u karcinomu žaludku, diskutuje též důležité souvislosti spojené s touto problematikou.

Klíčová slova:

Karcinom žaludku, HER2/neu receptor, amplifikace, imunohistochemie, *in situ* hybridizace, Q-PCR.

Abstract

Stomach cancer is a malignant neoplastic disease, which is caused by malignant transformation of the gastric mucosal epithelium. Elderly patients are more frequently affected, the majority of the patients are males. Stomach cancer has some typical features like minor symptomatology and early metastasis founding. Nowadays, a mild decrease of incidence is registered. Treatment of stomach cancer depends on its location and stage. Because of its relative chemo- and radioresistance, surgical resection is the only one potentially curable method, although there is high number of recurrences.

An amplification and overexpression of HER2 receptor is detected in approximately 10 - 20 % patients with stomach cancer. This overexpression correlates with worse prognosis of disease. Treatment with a monoclonal antibody named *trastuzumab*, Herceptin® could significantly elongate their life. Trastuzumab is now widely and successfully used for the treatment of female patients with breast carcinoma. Detection of HER2 amplification is there needed.

Treatment with trastuzumab can be useful only when HER2 positivity of tumor is determined. This determination should be made by a reliable test with sufficient sensitivity and specificity. The aim of this work is to summarize the methods of molecular biology that are used in HER2 status determination in stomach cancer, this work also discusses important links connected with this issue.

Key words:

Gastric cancer, HER2/neu receptor, amplification, immunohistochemistry, *in situ* hybridization, Q-PCR.

Obsah

1. Úvod.....	6
1.1. Karcinom žaludku – základní informace.....	6
1.2. Her2/neu a karcinom žaludku.....	8
1.3. Cíle bakalářské práce.....	8
2. Metody molekulární biologie pro prediktivní diagnostiku Her2/neu.....	10
2.1. Historický vývoj a současné trendy.....	10
2.2. Přehled používaných metod.....	11
2.2.1. <i>In situ</i> hybridizace.....	11
2.2.2. Imunohistochemie.....	12
2.2.3. PCR a další metody.....	13
2.2.4. Porovnání metod.....	14
2.3. Úskalí metod, fenomén intratumorózní heterogenity a hodnocení metastáz.....	14
2.4. Amplifikace vs. polyzómie.....	16
2.5. Vliv neoadjuvantní chemoterapie pro Her2 status nádorových buněk.....	16
2.6. Terapeutická rezistence.....	17
2.7. Vlastní výzkum.....	17
3. Závěr.....	18
4. Seznam zkratk.....	20
5. Použitá literatura.....	21
5.1. Články v odborných časopisech.....	21
5.2. Další použitá odborná literatura.....	26
5.3. Internetové zdroje.....	26
6. Přílohy.....	27

1. Úvod

1.1. Karcinom žaludku – základní informace

Karcinom žaludku, přesněji adenokarcinom žaludku, je maligní nádorové onemocnění, jehož výskyt v populaci není nikterak ojedinělý. Jeho incidence vykazuje poměrně výrazné geografické rozdíly. Největší incidence tohoto onemocnění je udávána v Japonsku. Incidence v ČR činí přibližně 15 nových případů na 100 000 obyvatel (epidemiologické statistiky jsou dostupné na internetové stránce Ústavu zdravotnických informací a statistiky - ÚZIS). V globálním měřítku však celková incidence karcinomu žaludku klesá. Karcinom žaludku vykazuje též rozdíly v distribuci mezi muži a ženami. Muži jsou postiženi častěji, i když tento poměr není výrazný (v literatuře udáván přibližně 1,5 : 1). Mortalita tohoto onemocnění je však velmi vysoká. V MKN10 (10. mezinárodní klasifikace nemocí) je karcinomu žaludku přiřazen kód C16.

Z hlediska patologické anatomie není karcinom žaludku jednotné onemocnění. Liší se svou lokalizací v žaludku (nejčastěji je lokalizován v oblasti pyloru, malé křivky - zakřivení a kardia) a též svojí makroskopickou morfologií (typ plochý, miskovitý a další). Na mikroskopické úrovni jsou rozlišovány základní dva druhy karcinomu (podle tzv. Laurenovy klasifikace) – intestinální a difúzní typ (**Obr. 1, 2**). Oba typy se odlišují nejen svou mikroskopickou strukturou, ale i rizikovými faktory vzniku, odpovědí na léčbu a prognózou.

U karcinomu intestinálního typu je prokázána jeho souvislost s expozicí některým rizikovým faktorům (alkohol, kouření, nitrosaminy pocházející z uzeného masa, nedostatek ovoce, zeleniny a s tím související nedostatek protektivních faktorů jako např. vitamínu C, E a dalších). Mezi další rizikové faktory patří nozologické jednotky jako je atrofická gastritida či gastritida na podkladě infekce bakterií *Helicobacter pylori*. Incidence karcinomu intestinálního typu, na rozdíl od difúzního typu, vykazuje mírný pokles. Karcinom difúzního typu je charakterizován méně pevnou vazbou k prokazatelným rizikovým faktorům, oproti tomu vykazuje větší podíl dědičnosti; jeho incidence, jak bylo zmíněno, neklesá.

Histologický typing rozlišuje i další typy a subtypy karcinomu žaludku, jako mucinózní, s buňkami typu pečetního prstenu (signet ring cell carcinoma, **Obr. 2**), skirhotický (fibrogenní) a další.

Patologický staging (tj. stádium onemocnění) je analogický jiným adenokarcinomům v jiných anatomických lokalizacích. Používá se obecně přijímaný koncept hodnocení stagingu dle WHO – tzv. TNM klasifikace (T – tumor, N – node, M – metastasis). Klinický staging karcinomu žaludku je analogický jiným onkologickým onemocněním; je používána čtyřstupňová škála I – IV, přičemž stupeň IV značí nejtěžší, generalizované metastazující onemocnění.

Průběh patologických změn přechází přes dysplázii, *carcinoma in situ*, do stádia invazivního adenokarcinomu s případným zakládáním vzdálených metastáz. Dysplázie značí cytologické změny v epitelu, které jsou prvopočátkem vzniku nádorového bujení, jsou identifikovatelné ve světelném mikroskopu zejména jako změna vzhledu buněčného jádra. *Carcinoma in situ* pak označuje nádorové bujení, kdy tumor nepřesahuje bazální membránu epitelu.

Nejobávanějším jevem je zakládání vzdálených metastáz. Typickými lokalizacemi lymfogenních metastáz jsou perigastrické lymfatické uzliny, nadklíčkové uzliny (tzv. Virchowova uzlina) či periumbilikální uzliny (tzv. příznak sestry Marie Josefy – Sister Mary Joseph sign). Hematogenní metastázy se nacházejí nejčastěji v játrech, plicích či např. v ovariu (tzv. Krukenbergův tumor).

Diagnostika karcinomu žaludku není vždy snadná. Pacient si obvykle stěžuje na necharakteristické příznaky (tupá bolest v epigastriu, nechutenství, hubnutí, slabost, příznaky anémie, nauzea, zvracení, odpor k některým jídlům, zejména k masu, atd.). Primární diagnostickou metodou je endoskopie, která umožňuje nejen makroskopický pohled do žaludku, ale též šetrný odběr biopsie z podezřelé slizniční léze.

Definitivní diagnóza může být stanovena pouze na základě histologického vyšetření získané tkáně. Tuto tkáň může patolog získat buď jako drobnou endoskopickou biopsii („endobiopsii“), jak je zmíněno výše, či jako resekát, tedy rozsáhlou tkáň postiženou nádorem a odstraněnou chirurgem. Pro úplnost je potřeba dodat, že patolog může obdržet i tzv. nekropsii, tedy vzorek tkáně odňatý kadaveróznímu pacientovi při pitvě. Pak je diagnóza stanovena či potvrzena *post mortem*.

Léčba karcinomu žaludku se odvíjí od jeho stádia. Nejdůležitější léčebnou modalitou je chirurgický zákrok; ten může být buď kurativní či paliativní. Kurativní léčba má za cíl vyléčení pacienta či zlepšení jeho prognózy. O kurativní léčbě je možno mluvit tehdy, pokud nejsou postiženy nádorem lymfatické uzliny. Paliativní výkon oproti kurativnímu má za cíl zlepšení klinických příznaků a vylepšení klinického stavu, nemá ambice na vyléčení pacienta či signifikantní prodloužení délky přežití.

Při chirurgické resekcí je naprosto zásadní vedení řezu do zdravé tkáně; tzn. chirurgické okraje resekatu, vyšetřeny následně patologem, musí být prosty nádorové infiltrace. Lem zdravé tkáně musí být též dostatečně široký. Tímto způsobem je možno efektivně předejít recidivě nádoru. Při operaci se odstraňuje nejen postižená žaludeční tkáň, ale i úpony žaludku, 12 – 16 perigastrických lymfatických uzlin a někdy též slezina; všechny tyto tkáně musí být též histologicky vyšetřeny.

Další typy onkologické léčby, jako je radioterapie a chemoterapie, již mají daleko nižší účinek, jsou použitelné jakožto adjuvantní léčba po základním chirurgickém zákroku či jako neoadjuvantní léčba před zákrokem. Dále může být chemoterapie použita pro paliativní léčbu inoperabilního či

diseminovaného karcinomu se špatnou prognózou. Nejčastěji je užívána kombinace cytostatik, např. 5-fluorouracil a deriváty platiny.

1.2. Her2/neu a karcinom žaludku

V poslední době se v onkologii stále více uplatňují farmaka na principu tzv. monoklonálních protilátek. Na obecné rovině, tato farmaka specificky vážou proteinovou strukturu, která svou signální transdukcí rozličným mechanismem podporuje tumorigenezi. Vazbou na tuto strukturu ji inhibují a tím inhibují i progresi onemocnění. Jejich název je tvořen koncovkou -mab (Monoclonal AntiBody). Písmena v názvu léku před touto koncovkou udávají, jakého charakteru tato protilátka je (např. -zumab – humanizovaná protilátka, -mumab – plně humánní protilátka atd.). Další písmena před touto složenou koncovkou udávají orgánový systém, který tato protilátka inhibuje dle domluvených zkratk (např. -tuzumab – humanizovaná monoklonální protilátka inhibující tumorózní proces, -limumab – plně humánní monoklonální protilátka inhibující proces v rámci imunitního systému apod.). I přes vysokou cenu těchto farmak se těší hojnému využívání v klinické praxi a do jejich výzkumu a rozvoji je investován velký potenciál.

Monoklonální protilátka *trastuzumab*, známá pod firemním názvem Herceptin, je použitelná tam, kde došlo k amplifikaci a overexpresi receptoru Her2/neu. Tento protein je protoonkogen (185 kDa), transmembránová receptorová tyrosin-kináza, patřící do rodiny receptorů pro epidermální růstový faktor (EGFR). Gen je lokalizován na dlouhém raménku chromozómu 17 (17q12-q21). Následná kaskáda, aktivovaná overexprimovaným proteinem Her2, působí změny v růstu, diferenciaci či přežití buňky.

V managementu léčby jsou používány dva odlišné termíny – prognostický a prediktivní faktor. Prognostický faktor udává vyhlídky pacienta na přežití ať už v souvislosti s léčbou nebo bez ní. Odvíjí se od typingu (typu nádoru), stagingu (stádia onemocnění), gradingu (stupně vyzrálosti nádoru). Prediktivní faktor se oproti tomu zabývá odpovědí na aplikovanou léčbu. V případě Her2 je amplifikace tohoto genu negativním prognostickým faktorem, avšak je pozitivním faktorem prediktivním při adekvátní biologické léčbě monoklonální protilátkou trastuzumab.

Pro grafické znázornění přežívání pacientů je používána tzv. Kaplan – Meierova křivka. Na ose x je vynášen čas přežívání, na ose y pak počet (procento) přeživších.

1.3. Cíle bakalářské práce

Z výše uvedených faktů je zřejmé, že správné stanovení Her2 u pacienta je základním předpokladem pro adekvátní biologickou léčbu.

Tato práce se zabývá metodami, které je možné pro stanovení Her2 statu pacienta použít. Diskutuje dnes známá fakta a úskalí v této problematice. Je potřeba zdůraznit fakt, že aplikace teoretických poznatků se klinická medicína dočkala až v roce 2010; je tedy zřejmé, že ne všechny otázky jsou v současné chvíli dostatečně zodpovězeny a na univerzální algoritmus se teprve čeká.

2. Metody molekulární biologie pro prediktivní diagnostiku Her2/neu

2.1. Historický vývoj a současné trendy

Genem Her2, jeho amplifikací a následnou overexpresí se vědecké práce zabývaly již před několika desítkami let. Nejvíce známo je o souvislosti Her2 a karcinomu prsu. Souvislostí Her2 a karcinomu žaludku se zabývaly práce již v roce 1991 (Jain *et al.* 1991, Yonemura *et al.* 1991) a zabývají se jimi dodnes.

Pozdější práce konce devadesátých let minulého století a první dekády tohoto století se již zabývaly porovnáním jednotlivých metod, vzájemným vztahem amplifikace a overexprese a využitím těchto poznatků pro léčbu pokročilého nádorového onemocnění léčivem již dobře známým a dostatečně účinným v léčbě karcinomu prsu (Ooi *et al.* 1998, Yano *et al.* 2006, Kim *et al.* 2007). Role Her2 byla zkoumána i u jiných druhů maligních nádorů, jako ovariální či endometroidní karcinom (Takehana *et al.* 2002). Tato práce se též jakožto ojedinělá zabývala detekcí sérové hladiny proteinového fragmentu p105 – fragmentu proteinu Her2 v krvi pomocí metody ELISA (viz dále).

Následně se objevila stěžejní práce v rámci této problematiky - randomizovaná kontrolovaná studie ToGA (Trastuzumab for Gastric Cancer) (Bang *et al.* 2010). Studie ToGA porovnávala výsledky 594 onkologických pacientů; ve studii byly zařazeny všechny rasy, různé typy karcinomu, z nichž drtivá většina byla metastazujících. Jejím výsledkem bylo zjištění, že u pacientů s pokročilým karcinomem žaludku či gastroesofageální junkce prodlužuje chemoterapie podávaná společně s trastuzumabem celkové přežití oproti těm, kteří byli léčeni pouze chemoterapií. Průměrné prodloužení života činilo 2,5 měsíce.

V roce 2010 pak americká FDA (Food and Drug Administration) schválila používání trastuzumabu společně s chemoterapií pro metastazující karcinom žaludku a gastroesofageální junkce.

Studie ToGA též přinesla zjištění, že detekce samotné amplifikace či overexprese genu Her2 nejsou pro indikaci následné biologické léčby dostačující. Publikovala zjištění, že pokud byla zjištěna amplifikace a zároveň neprokázána overexprese, trastuzumab nepřinesl signifikantní prodloužení života. Výsledkem byl závěr, že není vhodné spolehnout se na jednu metodu stanovení Her2.

Bang (2012) poté mimo jiné publikoval review shrnující do té doby známá fakta o této problematice.

Většina prací po roce 2010 do současnosti, zabývající se stanovením Her2 pozitivitou karcinomu žaludku, které budou uvedeny v dalším textu, se soustředí na porovnání různých metod, jejich hodnocení, reliabilitu, případnou diskrepanci mezi výsledky vyšetření a její vysvětlení; některé

práce se též zabývají porovnáním prób různých firem v rámci jedné molekulárně-genetické metody (Staněk *et al.* 2014).

Her2 byl též studován jakožto marker počínající dysplázie, tedy cytologických změn v epitelu nesoucích prvopočátek nádorového bujení (Lee *et al.* 2011).

Na základě těchto faktů se snaží najít neoptimálnější algoritmus vyšetření ve snaze o co nejspolehlivější výsledek, díky kterému se bude odvíjet další léčba a prognóza onemocnění pacienta.

2.2. Přehled používaných metod

Metody molekulární biologie, používané v současné době pro stanovení Her2 statu, je možné rozdělit do dvou kategorií, jak vyplývá z předešlého textu. Za první ty, které detekují overexprimovaný protein – **imunohistochemie** (IHC). Za druhé ty, které detekují amplifikaci sledovaného úseku DNA buňky – ***in situ* hybridizace** (ISH) v různých svých modifikacích a **kvantitativní PCR**.

U všech zmíněných metod se tkáň nejprve zpracovává klasickými metodami, tedy fixací ve formaldehydu a následně zalitím do parafínu (v angličtině se používá zkratka FFPE – formalin-fixed, paraffin-embedded). Tyto metody lze aplikovat i na nativní tkáň, avšak toto uvedené rutinní zpracování je nezbytné pro prvotní klasické histologické vyšetření vzorku barveného hematoxylinem a eozinem (HE).

Studie též ukázaly, že odlišnosti ve fixačních protokolech mohou ovlivnit výsledky těchto vyšetření (Yamashita-Kashima *et al.* 2014).

2.2.1. *In situ* hybridizace

Metody *in situ* hybridizace patří k základním a rutinním metodám používaným v molekulární patologii. Jejich aplikací pro tuto indikaci se hlouběji zabýval již Ooi *et al.* (1998).

Z modifikací *in situ* hybridizace je používána FISH (fluorescence ISH), CISH (chromogenic, colorimetric ISH) a SISH (silver ISH). Jejich princip je podobný – k denaturované DNA *in situ* fixovaných jader je přidána značená DNA próba. Tyto metody se liší značením této próby. U FISH je to značení fluorescenční barvou, u SISH a CISH jsou to próby značené antigenem; po adsorpci primární a sekundární protilátky je detekován chromogen peroxidázovou reakcí (CISH) či partikulemi Ag (SISH). U CISH a SISH je preparát dobarvován hematoxylinem (counterstaining). Z toho vyplývá, že pro FISH vizualizaci je zapotřebí použít fluorescenční mikroskop, u ostatních metod se pro vizualizaci používá světelný mikroskop.

Při metodě **FISH** je detekce centromer na chromozómu 17 obvykle vizualizována zeleným signálem a amplifikace Her2 lokusu pak lokus specifickou sondou s oranžovým signálem. Zároveň lze

detekovat signál kontur jádra díky barvení DAPI (4',6-diamino-2-fenylindol) (**Obr. 3**). Při odečítání vzorku zpracovaného metodou FISH je nutno pominout případnou nespecifickou hybridizaci a nespecifické signály. Existuje zde i fakt, že při tvorbě řezu může dojít k seříznutí jádra a následnému nesprávnému výslednému obrazu, pokud byla seříznuta část jádra s hybridizovanou sondou.

Výsledný obraz nádorových buněk zpracovaných metodou **CISH** může být velmi rozmanitý (**Obr. 4**). Při detekci 1 či 2 intranukleárních bodů chromogenu je nález hodnocen jako negativní. 3 – 5 bodů značí chromozomální polyzómii (viz dále). Amplifikace genu je vizualizovaná jakožto velký intranukleární cluster signálu či jako směs více bodů a menších clusterů (Kiyose *et al.* 2012).

Metoda **SISH** je v odečtu velmi podobná metodě CISH. Zde jsou však detekovány partikule stříbra jakožto černý signál (**Obr. 5**).

Metody ISH s sebou přinášejí své výhody i nevýhody (Kiyose *et al.* 2012). Nevýhodou FISH je nutnost odečítání na fluorescenčním mikroskopu, nutnost olejové imerze, nutnost použití digitální kamery, menší trvanlivost preparátu, potřeba skladování za specifických kautel (mrazící zařízení), fotobleaching signálu, nemožnost kvalitně rozeznat cytoarchitektoniku nádorové tkáně a vyšší pořizovací náklady. Avšak FISH umožňuje přes své nevýhody velmi kvalitní detekci signálu a patří ke zlatému standardu v hodnocení Her2 statu.

Výhodou SISH a CISH je možnost odečtu na klasickém světelném mikroskopu, možnost rozeznání cytoarchitektoniky tkáně (díky doplňujícímu barvení preparátu hematoxylinem) a dlouhodobá trvanlivost preparátu. Vyžadují však jistou zkušenost a erudici odečítajícího patologa či cytogenetika.

Další důležitý fakt, odlišující FISH od SISH a CISH je ten, že FISH je metodou manuální, vyžadující zkušenost tentokrátě školeného laboranta či laborantky, avšak celý proces, i když je závislý na lidském faktoru, je stále vizuálně kontrolován. Metody SISH a CISH jsou robotické, automatické. Nejsou tedy natolik závislé na lidském faktoru, avšak mohou mít své specifické nedostatky, jako např. přebarvení či nedobarvení preparátu.

2.2.2. Imunohistochemie

Imunohistochemické vyšetření patří k rutinním vyšetřením v praxi bioptika. Odlišnost od *in situ* hybridizace, jak bylo zmíněno výše, je ta, že imunohistochemie detekuje overexprimovaný protein.

Imunohistochemické hodnocení je v obecné rovině založeno na čtyřstupňové škále 0 – 3. 0 značí žádnou overexpresi, 3 značí vysokou overexpresi (**Obr. 6**). Případná diskrepance výsledků při stanovení Her2 statu při imunohistochemickém vyšetření může být způsobena různými klony

vyráběných firemních protilátek, subjektivitou interpretace, rozdílností v definici skórovacího systému či existencí tzv. intratumorózní heterogenity (Rüschoff *et al.* 2010).

Problematika hodnocení IHC je u karcinomu žaludku o něco složitější než u karcinomu prsu. Je to způsobeno inkompletní membránovou pozitivitou bazolaterální membrány (tvaru U) a intratumorózní heterogenitou. Hodnocení IHC nálezu je potřeba definovat díky tomuto faktu podrobněji (Hofmann *et al.* 2008, Rüschoff *et al.* 2010, Lee *et al.* 2012). Stupeň 0 značí žádnou membránovou pozitivitu či pozitivitu méně než 10 % nádorových buněk, stupeň 1 značí slabou parciální membránovou pozitivitu více než 10 % buněk, stupeň 2 značí mírnou či střední kompletní bazo/laterální membránovou pozitivitu více než 10 % buněk, stupeň 3 označuje silnou kompletní bazo/laterální membránovou pozitivitu více než 10 % buněk. V případě, že se v nádorové tkáni objeví více různě se barvících oblastí, vytvoří se definitivní IHC zhodnocení na základě procentuálního zastoupení jednotlivých oblastí.

2.2.3. PCR a další metody

Poslední používanou metodou je PCR, respektive kvantitativní PCR (qPCR), používaná v této indikaci. Jedná se o nejcitlivější metodu odhalení amplifikace genu Her2, avšak metoda hodnotí pouze DNA materiál daného vzorku, bez jakékoli možnosti korelace výsledku s histomorfologickým nálezem. Jako referenční gen je používán GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza). Lze ji použít jako metodu referenční (Staněk *et al.* 2014).

Existují i další možnosti stanovení, které však nejsou rutinně aplikovány (Kim *et al.* 2007). Mezi ně patří Western blotting a ELISA pro průkaz proteinové overexprese; Southern blotting pak pro detekci amplifikace genu.

Tajiri *et al.* (2014) recentně publikovat studii, zabývající se mimo jiné možností aplikace metody MLPA (multiple ligation-dependent probe amplification) pro detekci této amplifikace.

DNA je též možné získat pomocí metody manuální mikrodisekce z preparátu zpracovaného klasickým způsobem. Genetický materiál je následně zpracován metodou kvantitativní PCR (Lee *et al.* 2012).

Kim *et al.* (2007) uvádí praxi, kdy se před samotným započítáním práce se zkoumanými vzorky karcinomu žaludku provedlo zkušební stanovení na buněčných liniích karcinomu žaludku (např. linii SNU-1).

Jak již bylo zmíněno výše, někteří autoři (Takehana *et al.* 2002) se též pokusili stanovit cirkulující fragment proteinu Her2. Recentně se touto problematikou – detekcí extracelulární domény proteinu Her2 – zabývá Peng *et al.* (2014). Tato studie ukázala výraznou korelaci hladiny sérového

proteinu s Her2 statem stanoveného klasickými metodami. Tento výzkum je však v současnosti pouze v počátcích.

2.2.4. Porovnání metod

Je znám fakt, že procentuální zastoupení vzorků, u nichž je zjištěna amplifikace a těch, u nichž je zjištěna overexprese, není jednotné. Procento karcinomů s amplifikovaným Her2 je vyšší než procento těch, které nesou overexprimovaný protein. To v praxi znamená obecnou skutečnost, že ne každá buňka, která nese ve své genetické informaci amplifikovaný gen, ho musí nutně též exprimovat. Tento fakt ve své práci přehledně dokumentují Cho *et al.* (2012) či Chen *et al.* (2014). Výsledkem pak může být zjištění, že vzorek je ISH+ a při tom IHC 0/1, i když tento nálezn je krajně vzácný. Pro klinickou praxi je však důležitá proteinová exprese, díky které může být biologická léčba účinná. Jak už postulovala zmíněná studie ToGA (Bang *et al.* 2010), není vhodné spolehnout se na jednu metodu. Pouze jejich kombinace může poskytnout dostatečně validní výsledek.

Recentní studie (viz dále) porovnávají jednotlivé metody mezi sebou s cílem nalézt neoptimálnější algoritmus vyšetření s co možná nejvyšší spolehlivostí.

Výsledek IHC – 3 je brán jako přesvědčivá overexprese. Shoda IHC 3 a ISH+ se ve studiích blíží 100 %, stejně tak výsledek IHC 0 a ISH- (Tafe *et al.* 2011, Kiyose *et al.* 2012). Celkovou konkordanci mezi IHC a FISH metodou udává Chen *et al.* (2014) ve své studii přibližně 86 % (studováno na 118 vzorcích karcinomu žaludku). Diskrepance mezi jednotlivými modifikacemi ISH se pohybuje v jednotkách procent (García-García *et al.* 2011, Grin *et al.* 2013, Pala *et al.* 2013). Fox *et al.* (2012) se zabýval i porovnáním a hodnocením reliability mezi jednotlivými laboratořemi. Porovnal individuální rozdíly mezi 9 laboratořemi, z nichž každá laboratoř porovnávala 100 vzorků. Výsledkem bylo též doporučení stanovovat Her2 jak IHC, tak metodou ISH.

Huang *et al.* (2013) se zabýval porovnáním výsledků vyšetření Her2 statu mezi laboratořemi v Číně, výsledkem bylo zjištění vysoké míry shody mezi jednotlivými pracovišti; tato studie byla provedena na materiálu od 734 pacientů.

2.3. Úskalí metod, fenomén intratumorózní heterogenity a hodnocení metastáz

Aplikace metod stanovení Her2 statu u karcinomu žaludku musí řešit několik úskalí, které odlišují tento typ karcinomu od karcinomu prsu, u kterého byly tyto metody aplikovány nejdříve. Karcinom žaludku se rozvíjí v hostilním prostředí nízkého pH a současného výskytu ochranného mucinu. Rychlejší je zde autolýza vzorku. Všechny tyto aspekty mohou potenciálně negativně ovlivnit výsledek vyšetření.

U všech karcinomů bez rozdílu je důležité i množství bioptického materiálu a s tím související počet buněk, které patolog odečítá. U karcinomu žaludku se patolog setká buď s resekovaným materiálem či nesrovnatelně menším vzorkem tkáně získaného při vyšetření fibrogastroskopem. Při vyšetření této endobiopsie není možnost kontroly, z jaké části tumoru byl vzorek odebrán. Tento aspekt může ovlivnit výsledek odečtu, jelikož je známý fakt, že zejména u karcinomu žaludku se síla amplifikace může lišit v závislosti na topografické lokalizaci odběru vzorku - tzv. **intratumorózní heterogenita** (Lee *et al.* 2011, 2012, Yan *et al.* 2011, Kiyose *et al.* 2012, Watson *et al.* 2013, Yoshida *et al.* 2014). Tento fakt s sebou nese potřebu většího množství zkoumané tkáně, odečítání několika desítek až stovek nádorových buněk a vyžaduje podrobnější guidelines. Intratumorózní heterogenita je též jedním z možných vysvětlení tzv. terapeutické rezistence na trastuzumab, a to selekcí subklonů bez amplifikace (viz dále).

Existence intratumorózní heterogenity byla podrobně diskutována u problematiky karcinomu prsu. Ooi *et al.* (1998) na její existenci u karcinomu žaludku poukázal už na konci minulého století.

Intratumorózní heterogenita amplifikace Her2 je spjata s lepší prognózou pacienta (Lee *et al.* 2012). Větší počet kopií (gene copy number - CGN) je pak spjat s horší prognózou. Se zvyšujícím se počtem kopií roste však sensitivita vůči léčbě (Gomez-Martin *et al.* 2013). Podmínkou validního stanovení Her2 statu a jeho případné heterogenity je odečet co největšího vzorku tkáně, s dostatečným počtem nádorových buněk.

Intratumorózní heterogenita je při metodě IHC stanovena tehdy, když je potvrzena přítomnost 5 – 50 % nádorových buněk s výsledkem IHC vyšetření 2 nebo 3. Přítomnost více než 50 % buněk pro heterogenitu nesvědčí.

Intratumorózní heterogenita je ve většině případů stanovena u karcinomu difúzního či smíšeného typu dle Laurenovy klasifikace (Lee *et al.* 2012).

Poslední důležitý fakt potřebný zmínit je problematika stanovení této heterogenity, jelikož heterogenita se může objevit ve vzorcích nádorové tkáně z různých míst nádoru, může se objevit v různých řezech, avšak může se objevit i v jednom řezu. Hirschmann *et al.* (2012) porovnal výsledky amplifikace a overexprese v jednom řezu a tím se pokusil eliminovat prvky náhody při stanovení intratumorózní heterogenity.

Z tohoto důvodu studie, zabývající se intratumorózní heterogenitou (viz výše), uvádí širokou škálu hodnot, kolik procent případů karcinomu žaludku nese tuto heterogenitu. Práce se však shodují ve faktu, že heterogenita je častější u karcinomu žaludku než u karcinomu prsu.

Další otázkou je hodnocení Her2 statu u metastáz tumoru. Tímto problémem se zabýval Shibata *et al.* (2014). Zjistil, že existuje vysoká konkordance Her2 statu mezi primárním tumorem, jeho metastázou či rekurentní lézí. Stanovení Her2 statu u metastázy tedy nese velkou míru pravděpodobnosti, že stejný výsledek bude mít i primární ložisko.

2.4. Amplifikace vs. polyzómie

Dalším, neméně důležitým faktem je rozdíl ve skutečné amplifikaci Her2 při zachování diploidní sady kritického chromozómu 17 či pouze adekvátní overexpresi při **polyzómii** tohoto chromozómu. Polyzómie při metodě FISH je nalezena, pokud se v jádře nachází tři nebo více centromerických signálů, a to minimálně v 10 % nádorových buněk (Kiyose *et al.* 2012). Tento fakt však s sebou nese stejný fenotypický projev buňky – overexpresi Her2 a s tím související zvýšený proliferativní potenciál.

Je definován tzv. **Her2/CEP17 poměr** u metody FISH, na základě čehož lze usuzovat o amplifikaci a případné polyzómii nádorové buňky (Lee *et al.* 2012). Poměr více či roven 2 značí amplifikaci, 4 značí vysokou amplifikaci, poměr méně než 2 je pak bez amplifikace. V novějších guidelineech se již nerozlišuje prostá (poměr ≥ 2) a vysoká amplifikace (poměr ≥ 4), poměr více či roven 2 je tedy univerzálně brán jakožto amplifikace. Při výskytu více oblastí s různými Her2/CEP17 poměry je opět vypočítáno průměrné FISH skóre.

Amplifikaci Her2 vykazují zejména dobře či středně diferencované karcinomy dle jejich gradingu (podle WHO), stejně tak je tento fenomén typičtější pro intestinální typ karcinomu dle Laurenovy klasifikace (Kim *et al.* 2007). Tato studie též neprokázala žádný vztah amplifikace a stagingu (stádia) onemocnění, věku a pohlaví pacientů. Amplifikace byla též prokázána ve větší míře u karcinomů lokalizovaných v kardii žaludku či gastroesofageální junkci (Watson *et al.* 2013).

2.5. Vliv neoadjuvantní chemoterapie pro Her2 status nádorových buněk

V neposlední řadě je potřeba zmínit se o spojitosti neoadjuvantní chemoterapie a Her2 statu tumoru. Je prokázána možná rozdílnost výsledku vyšetření u pacientů, u kterých je odebrán vzorek – diagnostická endobiopsie před jakýmkoli zahájením léčby a u těch, u kterých byla zahájena neoadjuvantní chemoterapie a následně provedena resekce tumoru (Grillo *et al.* 2013).

Jak bylo zmíněno v úvodu, neoadjuvantní chemoterapie je léčba, která je zahájena před samotným chirurgickým výkonem. Nejčastěji je používána kombinace cytostatik 5-fluorouracil a derivátu platiny (např. cisplatina).

Při porovnání zjištěné amplifikace ze vzorků endobiopsie a resekátu téhož pacienta může tedy dojít k fenoménu poklesu/vymizení amplifikace Her2. Tento fenomén je vysvětlován selektivní chemosensitivitou Her2 pozitivních nádorových buněk (Grillo *et al.* 2013).

2.6. Terapeutická rezistence

I v případě trastuzumabu je známa existence terapeutické rezistence. Tato rezistence způsobí sníženou či prakticky nulovou efektivitu léčby. Může být vyvinuta od počátku léčby či se může vyvinout v průběhu podávání léku (tzv. sekundární rezistence).

Vysvětlení tohoto jevu existuje dnes několik. Zejména to jsou mutace v genech pro downstream signální proteiny, hlavně v signální kaskádě MAP kinázy (viz dále). Další možností vysvětlení rezistence je selekce rezistentních buněk a jejich perzistence, zatímco byly léčbou zahubeny sensitivní buňky.

Analýzou mutací u gastrointestinálních tumorů se velmi recentně zabýval Mafficini *et al.* (2014). Analyzoval metodou targeted multigene next-generation sequencing (TM-NGS) 46 genů důležitých pro tumorigenezi, mezi nimi i KRAS, BRAF, TP53 či EGFR. Byla zjištěna nejen inter-tumorózní, ale i intra-tumorózní heterogenita. Analýzou mutací v genech signální dráhy RAS-RAF-MEK-ERK a PI3K-AKT u pacientů s karcinomem žaludku se zabýval též Takahashi *et al.* (2014). Signální drahou PI3K-AKT a její alterací u karcinomu žaludku (zejména geny pro PTEN a PIK3CA) se zabýval Sukawa *et al.* (2014).

Byla též prokázána amplifikace genů těchto postreceptorových signálních molekul metodou FISH (Das *et al.* 2014).

Důležitým faktorem v této problematice je též gen pro Fc gamma receptor (FcγR), jehož polymorfismus úzce souvisí s funkcí ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity) a tím i s účinkem trastuzumabu (Mellor *et al.* 2013).

I když přínos pro klinickou medicínu na základě výše zmíněných poznatků není v současné době výrazně uplatněn, je více než pravděpodobné, že se terapie nádorových onemocnění bude nadále stále více „personalizovat“.

2.7. Vlastní výzkum

Autor této bakalářské práce se účastnil studie týkající se též této problematiky (Staněk *et al.* 2014). Tato studie porovnávala nejen metodu IHC, ISH a qPCR mezi sebou, ale též FISH próby jednotlivých firem (Dako, Abbott, ZytoVision). Shoda mezi próbami těchto firem byla 100 %. Shoda mezi všemi metodami (IHC, ISH a qPCR) byla v této studii 89 %.

3. Závěr

Závěrem práce je žádoucí shrnout hlavní a stěžejní poznatky v rámci diskutované problematiky. Pro větší přehlednost jsou hlavní informace uvedeny heslovitě.

- Her2/neu je gen pro receptorovou tyrosinkinázu. Patologická amplifikace a overexprese je pak charakteristickým rysem některých nádorových onemocnění, zejména nádoru prsu a žaludku. Tento fakt s sebou nese proliferační a antiapoptotické vlastnosti nádorových buněk.
- Tito pacienti mohou profitovat z léčby trastuzumabem, monoklonální protilátkou namířenou proti tomuto receptoru. Pro tuto indikaci je nezbytné validní stanovení Her2 statu.
- Her2 status může být zjištěn více různými metodami, pro rutinní klinickou praxi je používána in situ hybridizace, imunohistochemie a PCR.
- Všechny tyto metody vykazují vysokou spolehlivost, sensitivitu a specifitu. Správné určení Her2 statu závisí na množství a kvalitě tkáně, způsobu zpracování, subjektivním hodnocení, skórovacím systému a dalších faktorech.
- Je odlišena vlastní amplifikace genu Her2 a polyzómie, kdy není zachován diploidní počet kritického chromozómu 17. I zde však dochází ke klinicky významné overexpresi genu.
- Pro karcinom žaludku je typická tzv. intratumorózní heterogenita, která značí existenci více linií nádorových buněk v nádoru, které vykazují rozdílnou sílu amplifikace genu.
- Her2 status též ovlivňuje předchozí terapie, tedy neoadjuvantní chemoterapie, a to selekcí rezistentních klonů nádorových buněk.
- Terapeutická rezistence označuje nízkou či sníženou efektivitu léčby. Může být způsobena selekcí rezistentních klonů, mutacemi v postreceptorových signálních molekulách či genech účastnících se jevu ADCC.

Na úplném závěru je nutno dodat, že v testování Her2 u karcinomu žaludku existují určité nejasnosti:

- nejsou dosud přesně definovaná guidelines tohoto vyšetření
- není definován algoritmus, podrobnější metodika a není plně zakotven význam PCR v tomto stanovení
- nejistý je v současné době význam výsledku IHC 0/1 (negativní) a zároveň ISH pozitivní a jaký je v tomto případě přínos biologické léčby
- též je potřeba unifikovat indikace ze strany onkologa.

Tyto základní informace ve své praxi používá patolog, jehož úkolem je správně stanovit Her2 status. Na základě tohoto zjištění pak závisí nasazení biologické léčby klinickým onkologem.

I přes to, že patolog se s pacientem potká pouze formou mikroskopického preparátu, jeho činnost je elementární službou, která zásadním způsobem rozhoduje o prognóze pacienta.

4. Seznam zkratk:

ADCC – Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity

CISH – chromogenic ISH

DAPI – fluorescenční barva pro detekci jádra (4',6-diamino-2-fenylindol)

ELISA – enzyme-linked immuno-sorbent assay

FcγR – Fc gamma Receptor

FDA – Food and Drug Administration

FFPE – formalin-fixed, paraffin-embedded

FISH – fluorescence ISH

GCN – gene copy number (počet kopií genu)

HE – hematoxylin & eozin

IHC – imunohistochemie

ISH – *in situ* hybridizace

MAP kináza – mitogen-activated protein kináza

MKN10 – 10. mezinárodní klasifikace nemocí

MLPA – multiple ligation-dependent probe amplification

PCR – Polymerase Chain Reaction

qPCR – quantitative polymerase chain reaction

SISH – silver ISH

TM-NGS – targeted multigene next-generation sequencing

TNM – staging (T – tumor, N – node, M – metastasis)

ToGA – randomizovaná studie Trastuzumab for Gastric Cancer (2010)

ÚZIS – Ústav zdravotnických informací a statistiky

WHO – World Health Organization, Světová zdravotnická organizace

5. Použitá literatura

5.1. Články v odborných časopisech:

Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, Lordick F, Ohtsu A, Omuro Y, Satoh T, Aprile G, Kulikov E, Hill J, Lehle M, Rüschoff J, Kang YK. 2010. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*. 376(9742):687-97.

Bang YJ. 2012. Advances in the management of HER2-positive advanced gastric and gastroesophageal junction cancer. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 46(8):637-48. A Review.

Chen M, Li Y, Ming Z, Biao A, Zheng LX. 2014. Comparison of HER2 status by fluorescence in situ hybridisation and immunohistochemistry in gastric cancer. *Contemporary Oncology*. 18(2):95-9.

Cho EY, Srivastava A, Park K, Kim J, Lee MH, Do I, Lee J, Kim KM, Sohn TS, Kang WK, Kim S. 2012. Comparison of four immunohistochemical tests and FISH for measuring HER2 expression in gastric carcinomas. *Pathology*. 44(3):216-20.

Das K, Gunasegaran B, Tan IB, Deng N, Lim KH, Tan P. 2014. Mutually exclusive FGFR2, HER2, and KRAS gene amplifications in gastric cancer revealed by multicolour FISH. *Cancer Letters*. (epub ahead of print).

Fox SB, Kumarasinghe MP, Armes JE, Bilous M, Cummings MC, Farshid G, Fitzpatrick N, Francis GD, McCloud PI, Raymond W, Morey A. 2012. Gastric HER2 Testing Study (GaTHER): an evaluation of gastric/gastroesophageal junction cancer testing accuracy in Australia. *American Journal of Surgical Pathology*. 36(4):577-82.

García-García E, Gomez-Martin C, Angulo B, Conde E, Suarez-Gauthier A, Adrados M, Perna C, Rodriguez-Peralto JL, Hidalgo M, Lopez-Ríos F. 2011. Hybridization for human epidermal growth factor receptor 2 testing in gastric carcinoma: a comparison of fluorescence in-situ hybridization with a novel fully automated dual-colour silver in-situ hybridization method. *Histopathology*. 59(1):8-17.

Gomez-Martin C, Plaza JC, Pazo-Cid R, Salud A, Pons F, Fonseca P, Leon A, Alsina M, Visa L, Rivera F, Galan MC, Del Valle E, Vilardell F, Iglesias M, Fernandez S, Landolfi S, Cuatrecasas M, Mayorga M, Jose Paulés M, Sanz-Moncasi P, Montagut C, Garralda E, Rojo F, Hidalgo M, Lopez-Rios F. 2013. Level

of HER2 gene amplification predicts response and overall survival in HER2-positive advanced gastric cancer treated with trastuzumab. *Journal of Clinical Oncology*. 31(35):4445-52.

Grillo F, Fassan M, Ceccaroli C, Giacometti C, Curto M, Zagonel V, Ceppa P, Nitti D, Castoro C, Fiocca R, Rugge M, Mastracci L. 2013. The Reliability of Endoscopic Biopsies in Assessing HER2 Status in Gastric and Gastroesophageal Junction Cancer: A Study Comparing Biopsies with Surgical Samples. *Translational Oncology*. 6(1):10-6.

Grin A, Brezden-Masley C, Bauer S, Streutker CJ. 2013. HER2 in situ hybridization in gastric and gastroesophageal adenocarcinoma: comparison of automated dual ISH to FISH. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*. 21(6):561-6.

Hirschmann A, Lamb TA, Marchal G, Padilla M, Diebold J. 2012. Simultaneous analysis of HER2 gene and protein on a single slide facilitates HER2 testing of breast and gastric carcinomas. *American Journal of Clinical Pathology*. 138(6):837-44.

Hofmann M, Stoss O, Shi D, Büttner R, van de Vijver M, Kim W, Ochiai A, Rüschoff J, Henkel T. 2008. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology*. 52(7):797-805.

Huang D, Lu N, Fan Q, Sheng W, Bu H, Jin X, Li G, Liu Y, Li X, Sun W, Zhang H, Li X, Zhou Z, Yan M, Wang X, Sha W, Ji J, Cheng X, Zhou Z, Xu J, Du X. 2013. HER2 status in gastric and gastroesophageal junction cancer assessed by local and central laboratories: Chinese results of the HER-EAGLE study. *PLoS One*. 8(11):e80290.

Jain S, Filipe MI, Gullick WJ, Linehan J, Morris RW. 1991. c-erbB-2 proto-oncogene expression and its relationship to survival in gastric carcinoma: an immunohistochemical study on archival material. *International Journal of Cancer*. 48(5):668-71.

Kim MA, Jung EJ, Lee HS, Lee HE, Jeon YK, Yang HK, Kim WH. 2007. Evaluation of HER-2 gene status in gastric carcinoma using immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization, and real-time quantitative polymerase chain reaction. *Human Pathology*. 38(9):1386-93.

Kiyose S, Igarashi H, Nagura K, Kamo T, Kawane K, Mori H, Ozawa T, Maeda M, Konno K, Hoshino H, Konno H, Ogura H, Shinmura K, Hattori N, Sugimura H. 2012. Chromogenic in situ hybridization (CISH) to detect HER2 gene amplification in breast and gastric cancer: comparison with

immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH). *Pathology International*. 62(11):728-34.

Lee HE, Park KU, Yoo SB, Nam SK, Park DJ, Kim H, Lee HS. 2012. Clinical significance of intratumoral HER2 heterogeneity in gastric cancer. *European Journal of Cancer*. 49(6):1448-1457.

Lee S, de Boer WB, Fermoye S, Platten M, Kumarasinghe MP. 2011. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in gastric carcinoma: issues related to heterogeneity in biopsies and resections. *Histopathology*. 59(5):832-40.

Mafficini A, Amato E, Fassan M, Simbolo M, Antonello D, Vicentini C, Scardoni M, Bersani S, Gottardi M, Rusev B, Malpeli G, Corbo V, Barbi S, Sikora KO, Lawlor RT, Tortora G, Scarpa A. 2014. Reporting tumor molecular heterogeneity in histopathological diagnosis. *PLoS One*. 9(8):e104979.

Mellor JD, Brown MP, Irving HR, Zalcborg JR, Dobrovic AJ. 2013. A critical review of the role of Fc gamma receptor polymorphisms in the response to monoclonal antibodies in cancer. *Journal of Hematology and Oncology*. 6:1.

Ooi A, Kobayashi M, Mai M, Nakanishi I. 1998. Amplification of c-erbB-2 in gastric cancer: detection in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue by fluorescence in situ hybridization. *Laboratory Investigation*. 78(3):345-51.

Pala EE, Bayol U, Ozguzer A, Akman O. 2013. HER2 status in gastric cancer: a comparison of two novel in situ hybridization methods (IQ FISH and dual color SISH) and two immunohistochemistry methods (A0485 and HercepTest™). *Pathology, Research and Practice*. 209(9):548-54.

Peng Z, Liu Y, Li Y, Zhang X, Zhou J, Lu M, Li Q, Shen L. 2014. Serum HER2 extracellular domain as a potential alternative for tissue HER2 status in metastatic gastric cancer patients. *Biomarkers in Medicine*. 8(5):663-70.

Rüschhoff J, Dietel M, Baretton G, Arbogast S, Walch A, Monges G, Chenard MP, Penault-Llorca F, Nagelmeier I, Schlake W, Höfler H, Kreipe HH. 2010. HER2 diagnostics in gastric cancer-guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. *Virchows Archiv*. 457(3):299-307.

- Shibata R, Nimura S, Hashimoto T, Miyake T, Takeno S, Hoshino S, Nabeshima K, Yamashita Y. 2014. Expression of human epidermal growth factor receptor 2 in primary and paired parenchymal recurrent and/or metastatic sites of gastric cancer. *Molecular and Clinical Oncology*. 2(5):751-755.
- Staněk L, Rozkoš T, Laco J, Ryška A, Petruželka L, Důra M, Dundr P. 2014. Comparison of the immunohistochemistry, four in situ hybridization methods, and the quantitative PCR method in the molecular diagnosis of HER2 status in gastric cancer. A study on 55 cases. *Molecular Medicine Reports* (accepted for publication).
- Sukawa Y, Yamamoto H, Nosho K, Ito M, Igarashi H, Naito T, Mitsuhashi K, Matsunaga Y, Takahashi T, Mikami M, Adachi Y, Suzuki H, Shinomura Y. 2014. HER2 expression and PI3K-Akt pathway alterations in gastric cancer. *Digestion*. 89(1):12-7. A Review.
- Tafe LJ, Janjigian YY, Zaidinski M, Hedvat CV, Hameed MR, Tang LH, Hicks JB, Shah MA, Barbashina V. 2011. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in gastroesophageal cancer: correlation between immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 135(11):1460-5.
- Tajiri R, Ooi A, Fujimura T, Dobashi Y, Oyama T, Nakamura R, Ikeda H. 2014. Intratumoral heterogeneous amplification of ERBB2 and subclonal genetic diversity in gastric cancers revealed by multiple ligation-dependent probe amplification and fluorescence in situ hybridization. *Human Pathology*. 45(4):725-34.
- Takahashi N, Yamada Y, Taniguchi H, Fukahori M, Sasaki Y, Shoji H, Honma Y, Iwasa S, Takashima A, Kato K, Hamaguchi T, Shimada Y. 2014. Clinicopathological features and prognostic roles of KRAS, BRAF, PIK3CA and NRAS mutations in advanced gastric cancer. *BMC Research Notes*. 7:271.
- Takehana T, Kunitomo K, Kono K, Kitahara F, Iizuka H, Matsumoto Y, Fujino MA, Ooi A. 2002. Status of c-erbB-2 in gastric adenocarcinoma: a comparative study of immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization and enzyme-linked immuno-sorbent assay. *International Journal of Cancer*. 98(6):833-7.
- Watson S, Validire P, Cervera P, Zorkani N, Scriva A, Lemay F, Tournigand C, Perniceni T, Garcia ML, Bennamoun M, Paye F, Louvet C. 2013. Combined HER2 analysis of biopsies and surgical specimens to optimize detection of trastuzumab-eligible patients in eso-gastric adenocarcinoma: a GERCOR study. *Annals of Oncology*. 24(12):3035-9.

Yamashita-Kashima Y, Shu S, Yorozu K, Hashizume K, Moriya Y, Fujimoto-Ouchi K, Harada N. 2014. Importance of formalin fixing conditions for HER2 testing in gastric cancer: immunohistochemical staining and fluorescence in situ hybridization. *Gastric Cancer*. (Epub ahead of print).

Yan B, Yau EX, Choo SN, Ong CW, Yong KJ, Pang B, Salto-Tellez M. 2011. Dual-colour HER2/chromosome 17 chromogenic in situ hybridisation assay enables accurate assessment of HER2 genomic status in gastric cancer and has potential utility in HER2 testing of biopsy samples. *Journal of Clinical Pathology*. 64(10):880-3.

Yano T, Doi T, Ohtsu A, Boku N, Hashizume K, Nakanishi M, Ochiai A. 2006. Comparison of HER2 gene amplification assessed by fluorescence in situ hybridization and HER2 protein expression assessed by immunohistochemistry in gastric cancer. *Oncology Reports*. 15(1):65-71.

Yonemura Y, Ninomiya I, Ohoyama S, Kimura H, Yamaguchi A, Fushida S, Kosaka T, Miwa K, Miyazaki I, Endou Y *et al*. 1991. Expression of c-erbB-2 oncoprotein in gastric carcinoma. Immunoreactivity for c-erbB-2 protein is an independent indicator of poor short-term prognosis in patients with gastric carcinoma. *Cancer*. 67(11):2914-8.

Yoshida H, Yamamoto N, Taniguchi H, Oda I, Katai H, Kushima R, Tsuda H. 2014. Comparison of HER2 status between surgically resected specimens and matched biopsy specimens of gastric intestinal-type adenocarcinoma. *Virchows Archiv*. 465(2):145-54.

5.2. Další použitá odborná literatura:

PETRUŽELKA, Luboš a Bohuslav KONOPÁSEK. *Klinická onkologie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2003, 274 s., 7 obrazových příloh. ISBN 80-246-0395-0

HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTŮŇKOVÁ. *Základy imunologie*. 4. vyd. Praha: Triton, 2009, 316 s. ISBN 978-80-7387-280-9.

KUMAR, Vinay. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. 8th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2010, xiv, 1450 s. ISBN 978-1-4160-3121-5.

DABBS, David J. *Diagnostic immunohistochemistry*. 1st ed. New York: Churchill Livingstone, 2002, xiv, 673 s. ISBN 0-443-06566-7.

5.3. Internetové zdroje:

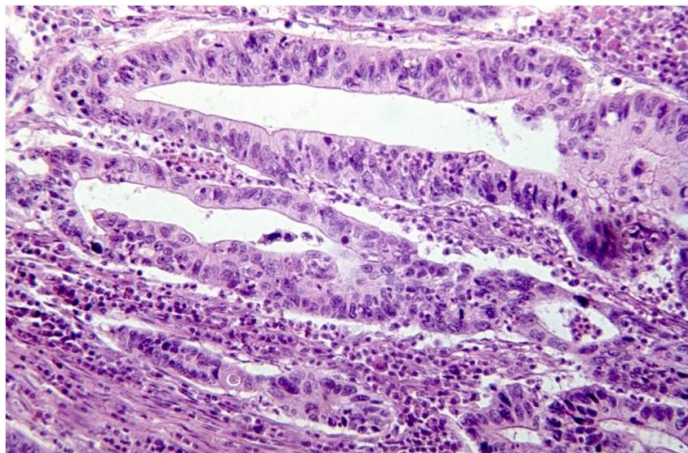
www.pubmed.com

www.uzis.cz

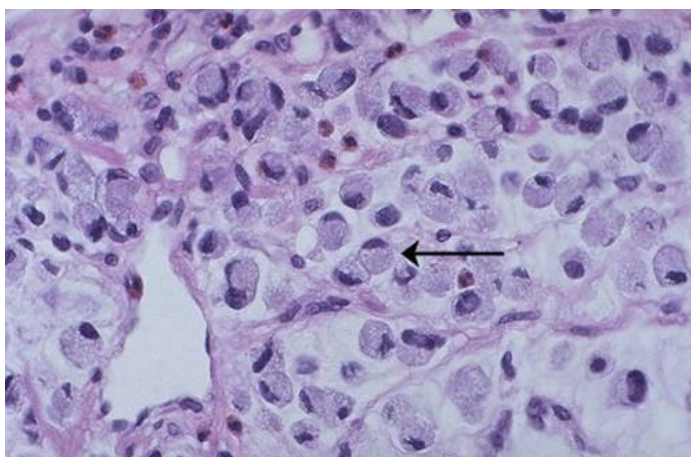
www.expertconsult.inkling.com

6. Přílohy

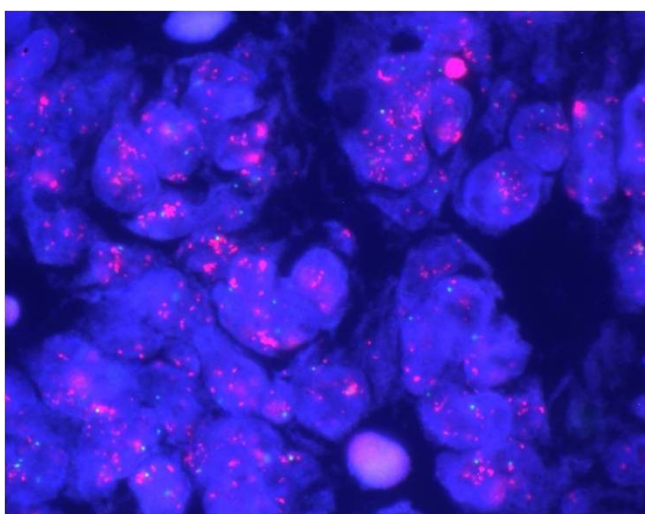
Pozn.: Všechny obrázky jsou vloženy s laskavým svolením Ústavu patologie 1. LF a VFN.



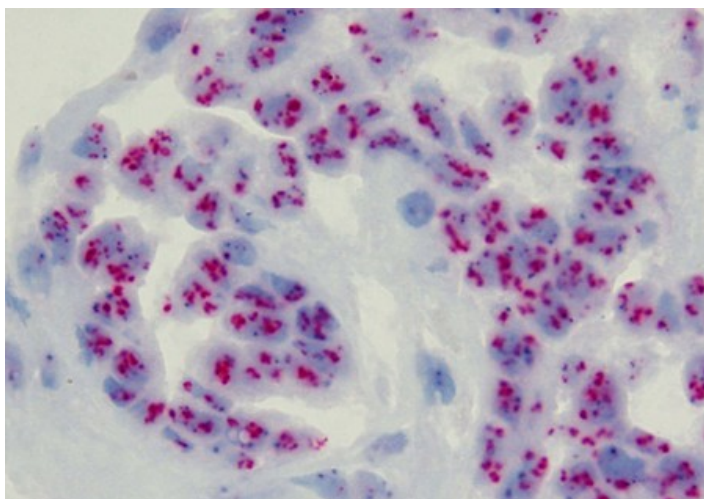
Obr. 1 Intestinální karcinom žaludku, HE.



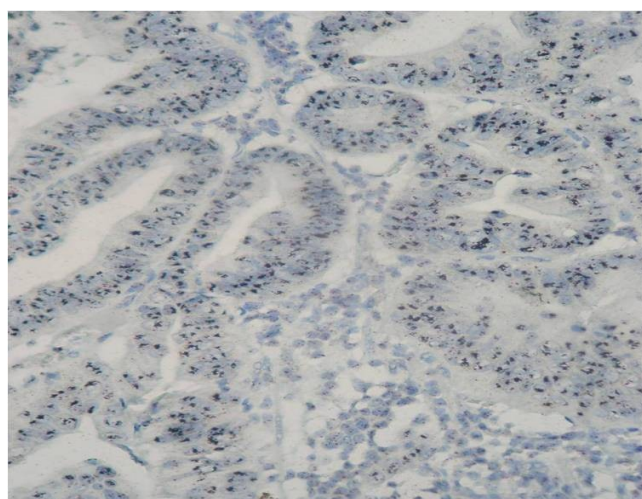
Obr. 2 Difúzní karcinom žaludku HE, podtyp s buňkami tvaru pečetního prstenu – signet ring cells (šipka).



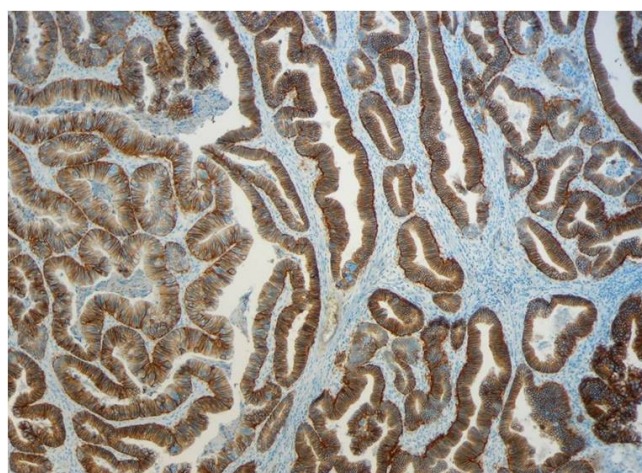
Obr. 3 FISH – vysoká amplifikace



Obr. 4. CISH – vysoká amplifikace



Obr. 5 SISH – vysoká amplifikace



Obr. 6 IHC - difúzní membránová pozitivita, hodnoceno jako stupeň 3.